香菇多糖改善砷染毒小鼠肝脂质蓄积与 ORP8 蛋白的关系

邓业康　鲍家成　杨渊*

广西环境暴露组学与全生命周期健康重点实验室，桂林医学院公共卫生学院，桂林 541199

摘 要

目的 探讨香菇多糖（LNT）调节亚砷酸钠（SA）染毒小鼠肝脏脂质蓄积与氧化固醇结合蛋白相关蛋白 8（oxysterol-binding protein-related protein 8, ORP8）的关系。**方法** 对 C57BL/6 雄性小鼠进行 SA 灌胃染毒，或 SA 染毒联合 LNT 干预处理后，应用油红 O 染色观察肝组织形态学特征，酶联免疫吸附试验检测甘油三酯（TG）和总胆固醇（TC）水平；免疫印迹（WB）实验检测肝组织 ORP8 表达和 LC3-Ⅱ/Ⅰ比值水平；分子模拟对接实验分析 LNT 与 ORP8 之间的相互作用。**结果** 与对照组相比，SA 染毒组显示肝组织脂质蓄积和 TG、TC 水平升高（P<0.05）；与 SA 染毒组相比，LNT 干预+SA 组显示肝组织脂质蓄积程度减轻，TG 和 TC 水平下调（P<0.05）；WB 实验结果显示，SA 染毒组相比对照组 ORP8 表达和 LC3-Ⅱ/Ⅰ比值水平降低，而 LNT 干预后显示 ORP8 表达和 LC3-Ⅱ/Ⅰ比值水平升高（P<0.05）。分子对接实验显示 LNT 分子中的氢原子与 ORP8 蛋白的氨基酸残基中的氧原子之间存在较稳定的氢键互作效应（平均结合能为-124.17 kcal/mol）。 **结论** LNT 改善砷染毒小鼠肝脏脂质蓄积，可能与 LNT-ORP8 相互作用有关。

[关键词] 香菇多糖；亚砷酸钠；肝脂质蓄积；氧化固醇结合蛋白相关蛋白 8（ORP8）

中图分类号:　R114

作者简介：邓业康，男（1999-），在读硕士研究生。

基金项目：基金项目：广西自然科学基金（2023JJA140042）；广西大学生创新训练项目（S202410601198）

通讯作者：杨渊，桂林医学院公共卫生学院，yang1977yuan@126.com

The relationship between Lentinan improving hepatic lipid accumulation and ORP8 protein in arsenic poisoned mice

Deng Yekang, Bao Jiacheng, Yang Yuan *

Guangxi Key Laboratory of environmental exposure omics and life cycle health, School of public health, Guilin Medical College, Guilin 541199, P.R. China

Abstract

Objective: To investigate the relationship between Lentinan (LNT) regulating hepatic lipid accumulation and oxidative sterol binding protein related protein 8 (ORP8) in mice exposed to sodium arsenite (SA). **Method:** C57BL/6 male mice were orally administered with SA or treated with SA combined with LNT intervention. Oil red O staining was used to observe the morphological characteristics of liver tissue, and enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) was used to detect the levels of triglyceride (TG) and total cholesterol (TC); Immunoblotting (WB) experiment was used to detect the expression of ORP8 and the LC3-II/I ratio in liver tissue; Molecular simulation docking experiment was used to analyze the interaction between LNT and ORP8. **Results** Compared with the control group, the SA exposed group showed liver tissue lipid accumulation and an increase in TG and TC levels ($P<0.05$); Compared with the SA exposed group, the LNT intervention+SA group showed a reduction hepatic lipid accumulation and a downregulation of TG and TC levels ($P<0.05$); The WB experiment results showed that the downregulations of ORP8 expression and the LC3-II/I ratio in the SA exposed group compared to the control group, while LNT intervention showed an increase in ORP8 expression and LC3-II/I ratio ($P<0.05$). Molecular docking experiments showed that there is a stable hydrogen bonding interaction between the hydrogen atoms in LNT molecules and the oxygen atoms in the amino acid residues of ORP8 protein (average binding energy is -124.17 kcal/mol). **Conclusion** LNT improves lipid accumulation in the liver of arsenic poisoned mice, which may be associated with the interaction with LNT-ORP8.

[**Keywords**] Lentinan; Sodium arsenite; Hepatic lipid accumulation; oxidative sterol binding protein related protein 8 (ORP8)

Funding: Guangxi Natural Science Foundation (2023JJA140042); Guangxi University Student Innovation Training Program (S202410601198).
Correspondence address: Yang Yuan, School of public health, Guilin Medical College, E-mail:yuany2045@glmc.edu.cn

亚砷酸钠（sodium arsenite，SA）是一种自然环境中常见的化学毒物，可污染土壤、饮用水或食物，微量摄入后对机体肝脏造成中毒性损伤。调查发现环境砷暴露与人群非酒精性脂肪肝病（NAFLD）、2 型糖尿病（T2DM）等疾病发生密切相关[1-2]。动物实验显示 SA 染毒可诱导小鼠肝脏葡萄糖不耐受、胰岛素信号通路受损和胰岛素抵抗[3]，而胰岛素抵抗模型大鼠亦发现肝内游离脂肪酸（FFA）转运增加和脂质沉积[4]，而肝细胞脂质的异常沉积可通过糖异生、组织炎症反应、氧化应激和胰岛素信号通路受损等机制诱导胰岛素抵抗发生[5]，因此肝脏脂质蓄积被认为是 NAFLD[6]和 T2DM[7]发生的病理机制。脂自噬是一种选择性以脂滴为底物，通过脂滴与泛素蛋白（Ub）和自噬体 LC3 蛋白结合形成自噬泡，进而与溶酶体融合并经溶酶体中水解酶降解细胞内脂质成分的生物学过程[8]。近来发现，氧化固醇结合蛋白相关蛋白 8（oxysterol-binding protein-related protein 8, ORP8）是介导脂自噬的调控因子[9]，研究发现，应用 shRNA 技术使 ORP8 基因沉默表达的巨噬细胞呈现出脂质（包括游离胆固醇和胆固醇酯（CE））水平升高的特征[10]，而小鼠肝脏 ORP8 过表达则显示血清和肝组织总胆固醇（TC）、磷脂和甘油三酯（TG）水平降低的特征[11]。香菇多糖（Lentinan，LNT）是一种从食用菌香菇中提取的生物活性多糖，本课题组前期动物实验发现 LNT 干预可拮抗 SA 染毒小鼠拮抗肝脏脂质蓄积，降低肝组织甘油三酯（TG）和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3（NLRP3）炎症小体水平[12-13]。目前 ORP8 是否参与 LNT 拮抗 SA 染毒小鼠脂质蓄积的机制不清楚。因此，本研究通过动物实验探讨了 LNT 调节砷中毒小鼠肝脏脂质蓄积与 ORP8 的关系。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　试剂：SA，分子式 $NaAsO_2$, CAS.7784-46-5，购自西格

玛奥德里奇(Sigma-Aldrich)公司；LNT, CAS.37339-90-5，本课题组使用超声波辅助+酶解+热解+发酵法提取，多糖含量：90%；ELISA 检测试剂盒：甘油三酯含量测试盒（TG，DM-X6707）、总胆固醇（TC，DM-X6708），购自上海笃玛生物科技有限公司。一抗抗体试剂来源于艾博抗（Abcam 公司）：anti-LC3B/A（ab62721）、anti-ORP8。主要仪器：赛默飞世尔冰冻切片机（Cryotome FSE 型）；800 TS 吸收光酶标仪（美国 BioTek 公司）；红外激光扫描成像系统（Odyssey9120，LI-COR 公司）。

1.2　动物实验方案　SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠购自长沙斯莱克实验动物有限公司（生产许可证号：SCXK(湘)2021-0002），体质量范围（26.5±1.0）g，鼠龄 9～10 周，饲养条件为：温度 20~24℃，相对湿度 40~60%，12 h 明暗交替周期。实验方案经桂林医学院实验动物伦理委员会（GLMC20230712）批准，实验操作严格按照实验动物使用的 3R 原则进行，实验分为Ⅰ~Ⅳ组（n=6/组）：Ⅰ-对照组（常规条件喂养小鼠，自由饮水）、Ⅱ-SA 染毒组（SA 以 5.0 mg/kg.kw 剂量进行灌胃染毒，隔日 1 次，8 周）、Ⅲ-香菇多糖干预+SA 组（香菇多糖以 50.0 mg/kg.kw 剂量进行灌胃干预，12 小时后进行Ⅱ剂量 SA 灌胃染毒，隔日 1 次，8 周），Ⅳ-LNT 对照组，应用Ⅲ中 LNT 剂量方法进行处理小鼠，作为 LNT 干预对照。实验结束后，用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉并处死小鼠，采集小鼠血清和分离肝组织，进行组织形态学、生化实验、酶联免疫吸附（Elisa）和免疫印迹实验，检测肝功能、肝组织脂质含量和 ORP8 及自噬相关蛋白表达。

1.3　肝组织形态学与指标检测

1.3.1 油红 O 染色　肝组织样本使用 OCT 包埋剂制备冰冻组织切片，然后进行油红 O 染色，在显微镜下评价肝组织脂质沉积特征，肝脏组织中桔红色颗粒或

团块代表脂肪颗粒，蓝色代表细胞核着色。

1.3.2 肝组织脂质水平　分离小鼠肝脏，用 PBS 缓冲液冲洗去残余血液，置于 Dounce 匀浆器（10% w/v）制备肝组织匀浆，同时加入含有 0.05%Ⅱ型胶原酶的 RPMI（洛斯维.帕克纪念研究所）培养基，37℃孵育 30 min，然后经反复冻融后在 1500×g 条件下低温离心 10 分钟，收集上清液，按照小鼠 ELISA 试剂盒说明书操作步骤，对肝组织 TG 和 TC 含量进行检测分析。

1.4 免疫印迹（WB）实验

WB 实验：肝组织匀浆加入 RIPA 裂解液使肝组织细胞裂解，然后提取总蛋白和测定蛋白浓度，样品经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）凝胶电泳、转膜、封闭后，加入 ORP8 或 LC3Ⅱ/Ⅰ一抗孵育和酶标记二抗孵育，设置内参β-actin，然后通过化学发光及显影获得靶蛋白表达条带影像。实验结果应用条带积分吸光度（IA）进行相对定量分析，分析样品中靶蛋白（ORP8、LC3-Ⅱ/Ⅰ）表达特征（IA/IA_0 或 IA_B/IA_A）。

1.5 分子模拟对接试验

应用殷赋云生物医药科技平台（https://www.yinfotek.com/）进行化学物分子对接模拟试验，以 LNT 作为配体，以 ORP8 作为受体，分别输入配体分子 mol2 文件和受体的 3D 化学结构 PDB 文件，通过 ZDOCK 在线服务网站（https://zdock.wenglab.org/），应用 ZDOCK 法对 LNT 与 ORP8 进行模拟分子对接实验，点击运行后可得到 LNT 与 ORP8 蛋白相互作用预测结果图。

1.6 统计学分析　数据以均数±标准差（$\overline{X}\pm SD$）表示，应用统计软件 SPSS V27.0 进行数据统计分析。统计学差异通过单因素方差分析（ANOVA）检验和最小显著性差异（LSD）法进行比较评估，$P\leqslant0.05$ 为有统计学差异检验水准。

2 结 果

2.1 香菇多糖降低 SA 染毒小鼠肝脏脂质水平和脂质蓄积

如**图 1** 所示，相比Ⅰ-对照组，Ⅱ-SA 染毒组显示血清 TG、TC 水平升高（*P*<0.05），肝组织油红 O 染色显示部分区域呈现桔红色颗粒或团块沉积，部分肝细胞/组织呈现脂滴空泡、脂质蓄积特征（脂质呈红色或橘红色分布）。与Ⅱ组相比，Ⅲ组 LNT 干预+SA 染毒组显示血清 TG 和 TC 水平明显降低（*P*<0.05），肝组织冰冻切片显示脂质蓄积程度减轻。提示 LNT 干预改善肝脂质蓄积。

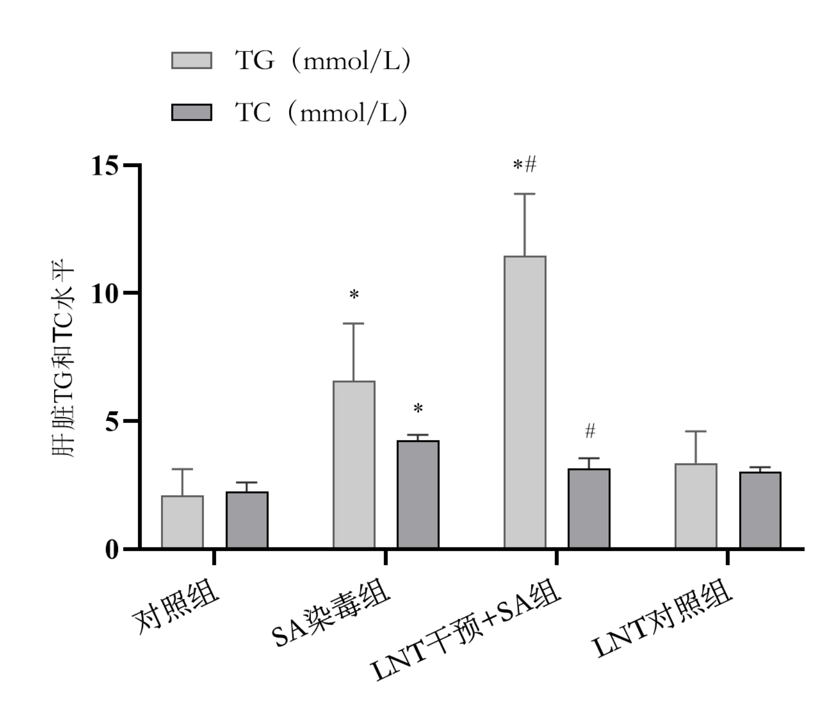


图 1-A LNT 干预后肝脏 TG 和 TC 水平特征
（n=6, $\bar{\chi}$±SD; * 与对照组相比, *P*<0.05; # 与 SA 染毒组比较, *P*<0.05）

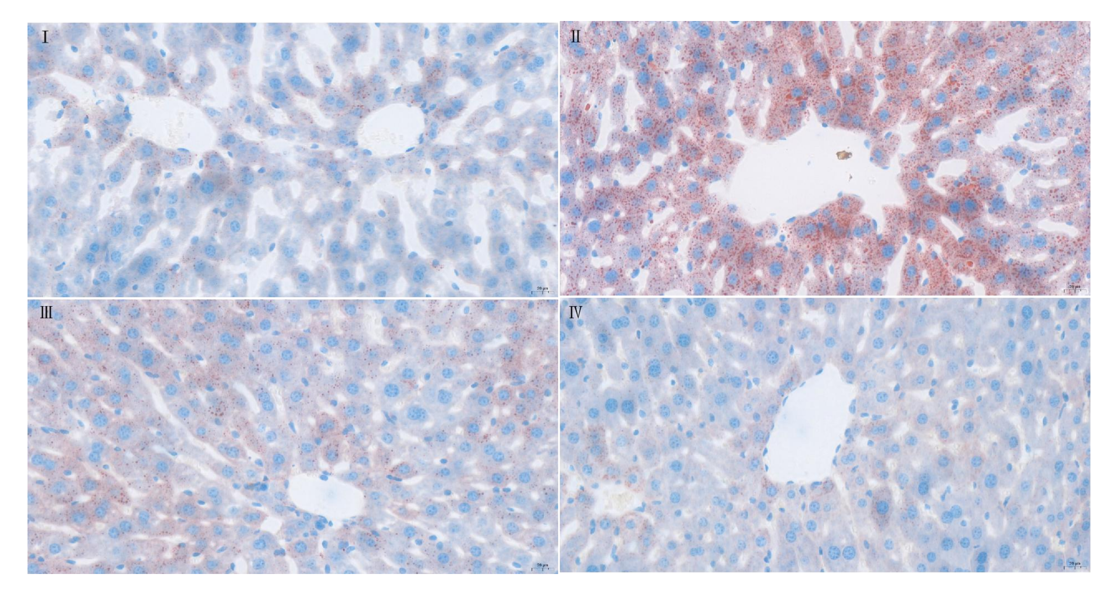
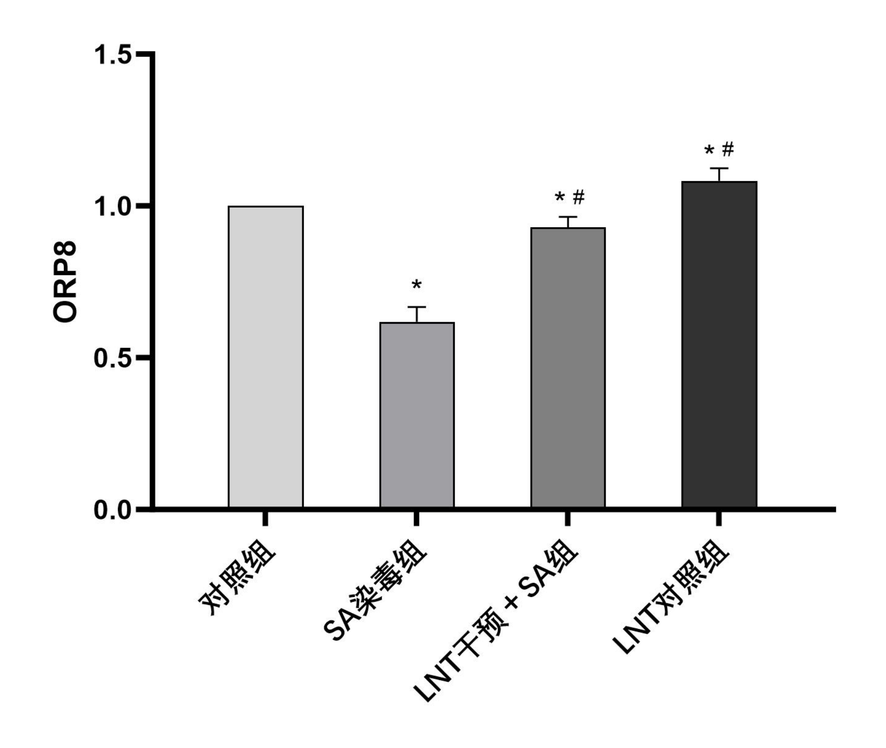


图 1-B. 小鼠肝组织油红 O 染色特征（×40，桔红色代表脂肪颗粒，紫蓝色为细胞核）

注：Ⅰ，对照组；Ⅱ，SA 5.0 mg/kg.kw 染毒组；Ⅲ，LNT 50.0 mg/kg.kw 干预+SA 组；Ⅳ，LNT 干预对照组；染毒方式及干预时间：灌胃，8 周

2.2 LNT 上调肝组织 ORP8 和自噬启动蛋白 LC3-Ⅱ/Ⅰ比值水平

如**图 2** WB 实验结果所示，与Ⅰ-对照组相比，Ⅱ-SA 染毒组显示肝组织 ORP8 蛋白表达降低，自噬启动蛋白 LC3-Ⅱ/Ⅰ比值水平亦明显降低（$P<0.05$）。与Ⅱ-SA 染毒组相比，Ⅲ-LNT 干预+SA 染毒组显示 ORP8 和 LC3-Ⅱ/Ⅰ比值水平明显升高（$P<0.05$）。结果提示 SA 染毒诱导小鼠肝组织脂自噬调控蛋白 ORP8 活性抑制，而 LNT 可拮抗 SA 染毒小鼠肝组织的脂自噬抑制效应。



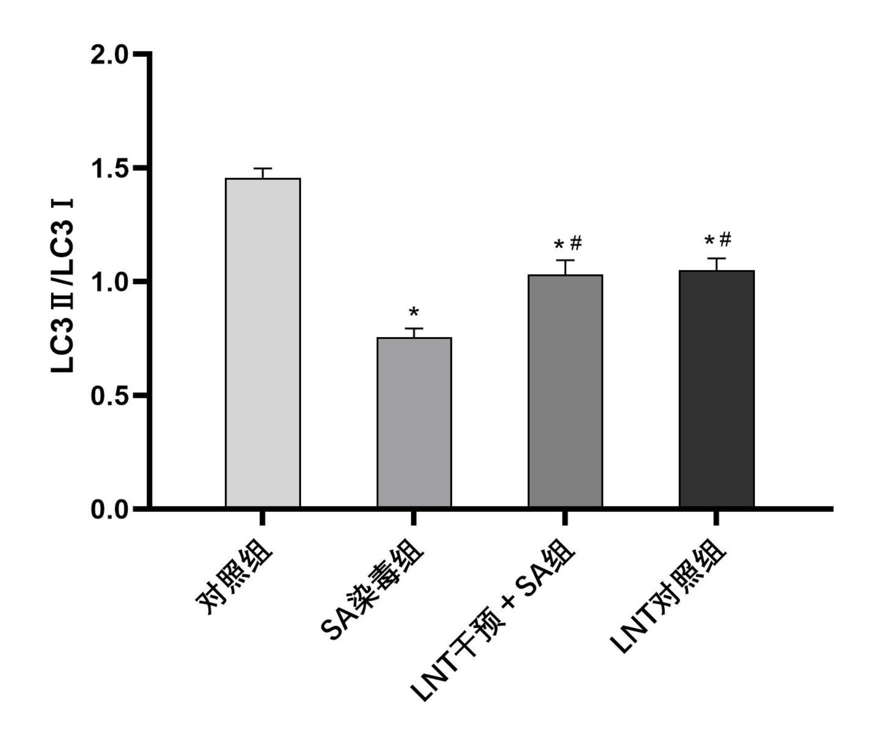


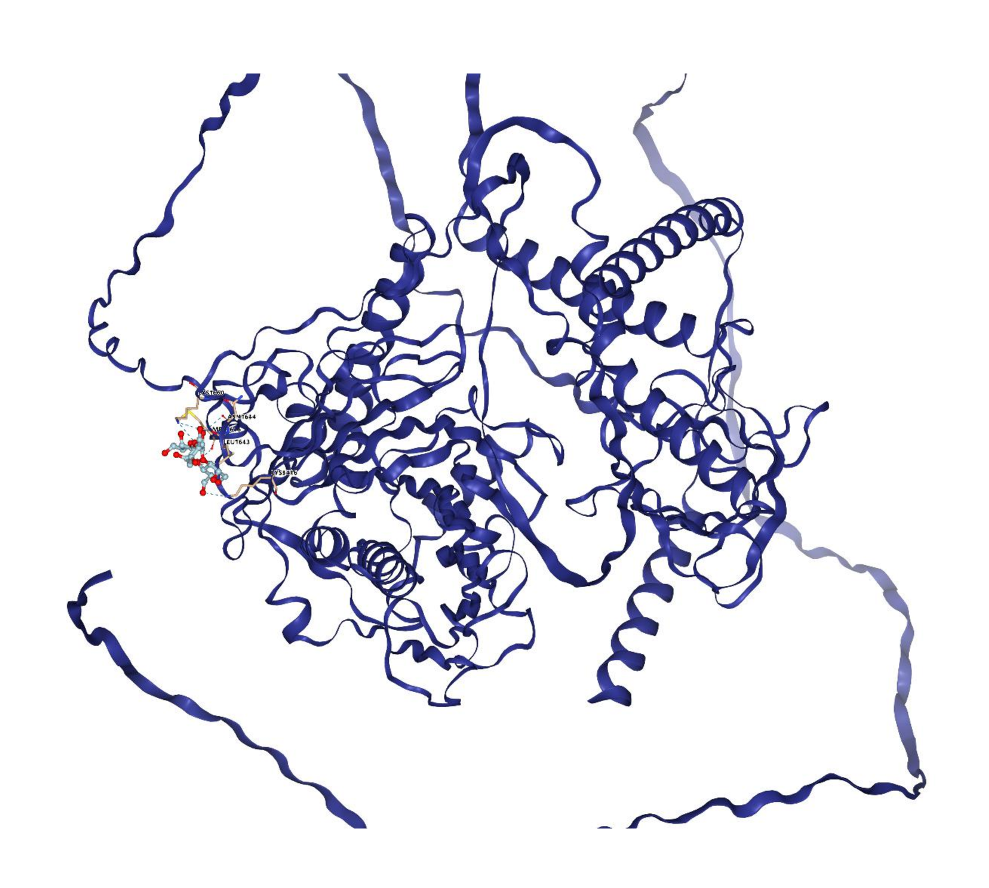
图 2. SA 染毒或 LNT 干预后肝脏 ORP8 和 LC3-Ⅱ/Ⅰ水平

n=3, $\bar{\chi}$±SD; * 与对照组相比, P<0.05; # 与 SA 染毒组比较, P<0.05。

2.5 LNT 与 ORP8 蛋白之间的分子对接

香菇多糖-LNT 是食用菌香菇中分离的以β-1→3-葡聚糖结构为主链的活性多

糖，因此我们以其主链β-1→3-葡聚糖 3D 结构作为配体，探讨了 LNT 与 ORP8 蛋白之间的相互作用。分子对接实验结果显示（**图 3**），LNT 的β-1→3-葡聚糖主链中氢原子与 ORP8 分子的蛋氨酸（Met）、赖氨酸（Lys）、天冬酰胺（Asn）和亮氨酸（Leu）残基中的氧原子之间存在氢键互作效应（平均结合能为-124.17 kcal/mol）。该结果提示，LNT 可通过与 ORP8 蛋白发生相互作用，通过 ORP8 介导的脂自噬改善 SA 诱导的小鼠肝脏脂质蓄积。



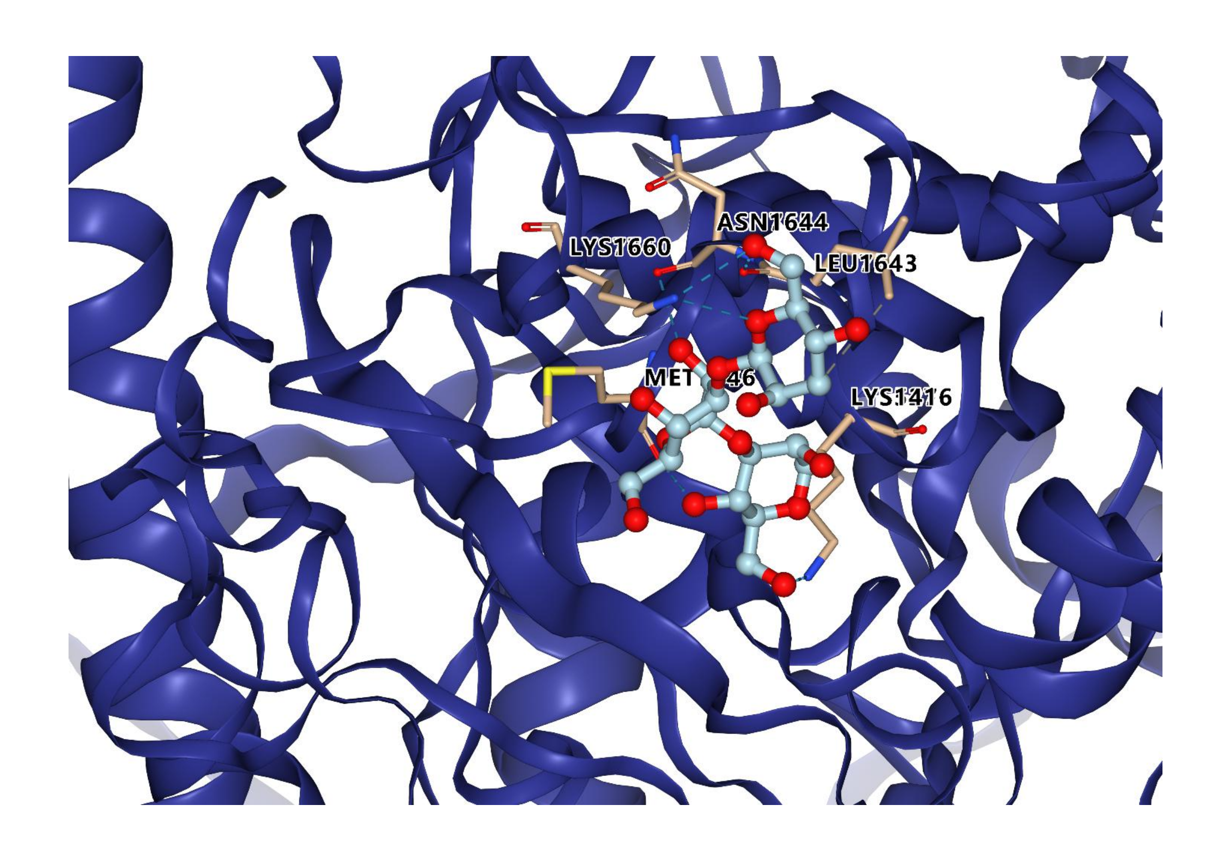


图 3. LNT 与 ORP8 蛋白之间分子对接

3 讨论

据搜狐网（https://news.sohu.com/a/760224709_121489825）报道，我国的香

LC3B
（Arg69; 70）→
← FTMT
（MET1; SER3）

菇人工栽培十分普及，近 3 年年产量均在 1200 万吨以上，是世界上第一香菇生产和出口大国。研究发现，香菇中富含的生物活性多糖，被称为香菇多糖，其商品名为伦蒂南（Lentinan，LNT） ⑵ FTMT 与 LC3B 互作 菌香菇中提取以β-1, 6; 1, 3-葡聚糖结构为主链的生物活性多糖，呈三螺旋空间构象，相对分子量约为 6.5~70×104[14]，具有较高的抗氧化能力[15]和免疫调节活性[16]。既往研究显示，LNT 经吸收入血后主要在肝脏浓集，肝脏是 LNT 在机体内代谢的靶器官[14]。LNT 具有改善高脂饮食（HFD）诱导的非酒精性脂肪肝病（Nonalcoholic Fatty Liver Disease，NAFLD）模型小鼠肝脏脂质蓄积的生物学活性[17]，而肝脂肪变性可促进巨噬细胞来源的泡沫细胞形成，是动脉粥样硬化（Atherosclerosis，AS）发生

发展的重要诱因[18]。目前，LNT 调节肝脏脂质蓄积的内在机制不清楚。

在本次研究中，我们发现 SA 染毒小鼠显示脂质蓄积和肝组织脂质（TG、TC）水平升高，脂自噬调控蛋白 ORP8 和自噬体蛋白 LC3-Ⅱ/Ⅰ比值降低，而 LNT 干预显示出对 SA 染毒小鼠肝脏脂质水平、ORP8 蛋白和 LC3-Ⅱ/Ⅰ比值的拮抗效应。该结果提示 LNT 改善 SA 诱导的肝脏脂质蓄积与脂自噬调控蛋白 ORP8 激活相关。在本研究中我们通过 ZDOCK 分子对接实验还发现 LNT 与 ORP8 蛋白存在较稳定的氢键相互作用。该结果进一步提示 LNT 改善 SA 染毒小鼠肝脏脂质蓄积与 ORP8 蛋白有关，LNT 通过 ORP8 蛋白介导细胞脂自噬激活，从而改善肝脏脂质蓄积。

综上，本次研究发现 LNT 干预可升高肝组织 ORP8 水平和自噬体蛋白 LC3-Ⅱ/Ⅰ比值，对砷染毒小鼠肝组织脂质含量和脂质蓄积产生拮抗作用，ORP8 蛋白可能在 LNT 调节肝脏脂质蓄积过程中发挥重要的角色。由于本次研究尚缺乏 ORP8 基因干预调节肝组织脂质蓄积的更多实验证据，在未来的工作中应构建 ORP8 基因沉默或过表达干预的肝脏/肝细胞脂质蓄积模型，通过 LNT 或联合自噬抑制/激活靶向干预，进一步探索 ORP8 在 LNT 调节肝脏脂质蓄积中的生物学机制。

作者贡献声明

所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Frediani JK, Naioti EA, Vos MB, et al. Arsenic exposure and risk of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) among U.S. adolescents and adults: an association modified by race/ethnicity, NHANES 2005-2014 [J]. Environ Health, 2018, 17(1): 6.

[2] Kim NH, Mason CC, Nelson RG, et al. Arsenic exposure and incidence of type 2 diabetes in Southwestern American Indians. Am J Epidemiol. 2013, 177(9):962-9.

[3] Jia X, Qiu T, Yao X, et al. Arsenic induces hepatic insulin resistance via mtROS-NLRP3

inflammasome pathway. J Hazard Mater. 2020, 399:123034.
[4] 崔丽娟，都健，王娟. 胰岛素抵抗大鼠内脏脂肪量与脂代谢紊乱的相关性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(9):1230-1232,1236.
[5] Pereira S, Park E, Mori Y, et al. FFA-induced hepatic insulin resistance in vivo is mediated by PKCδ, NADPH oxidase, and oxidative stress. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2014, 307(1):E34-46.
[6] 窦爱霞，陆伦根. 胰岛素抵抗和非酒精性脂肪性肝病研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(12):1197-1202.
[7] 刘福君，常李李，王为兰，等. 肝脏胰岛素抵抗与 2 型糖尿病[J]. 中国医学科学院学报, 2022, 44(4):699-708.
[8] 付婉，董笛，赵颖. 自噬的相关分子机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(5):448-455.
[9] Pu M, Zheng W, Zhang H, Wan W, Peng C, Chen X, Liu X, Xu Z, Zhou T, Sun Q, Neculai D, Liu W. ORP8 acts as a lipophagy receptor to mediate lipid droplet turnover[J]. Protein Cell. 2023, 14(9):653-667.
[10] Vihervaara T, Käkelä R, Liebisch G, Tarasov K, Schmitz G, Olkkonen VM. Modification of the lipidome in RAW264.7 macrophage subjected to stable silencing of oxysterol-binding proteins. Biochimie. 2013, 95(3):538-47.
[11] Zhou T, Li S, Zhong W, Vihervaara T, Béaslas O, Perttilä J, Luo W, Jiang Y, Lehto M, Olkkonen VM, Yan D. OSBP-related protein 8 (ORP8) regulates plasma and liver tissue lipid levels and interacts with the nucleoporin Nup62. PLoS One. 2011, 6(6):e21078.
[12] 戴宗英，伍纤纤，杨渊. 香菇多糖拮抗亚砷酸钠诱导小鼠肝脏脂质沉积的实验研究 [J]. 公共卫生与预防医学, 2024, 35(1): 20-23.
[13] Yang Y, Song S, Nie Y, et al. Lentinan alleviates arsenic-induced hepatotoxicity in mice via downregulation of OX40/IL-17A and activation of Nrf2 signaling [J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2022, 23(1): 16.
[14] 张玉, 张琪琳, 王静林, 郑子明，王凯平. 香菇多糖构效关系、抗肿瘤作用机制及药代动力学研究进展[J].中国医院药学杂志, 2023, 43(07):804-812.
[15] Zi YS , Zhang B, Jiang B, et al. Antioxidant action and protective and reparative effects of lentinan on oxidative damage in HaCaT cells [J]. J Cosmet Dermatol, 2018, 17(6): 1108-1114.
[16] Xu XF, Yan HD, Tang J, et al. Polysaccharides in Lentinus edodes: isolation, structure, immunomodulating activity and future prospective [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2014, 54(4): 474-487.
[17] Du T, Fang Q, Zhang Z, Zhu C, Xu R, Chen G, Wang Y. Lentinan Protects against Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Reducing Oxidative Stress and Apoptosis via the PPARα Pathway. Metabolites. 2022, 12(1):55.
[18] Chen X, Chen S, Pang J, Huang R, You Y, Zhang H, Xiao J, Xue H, Ling W. Hepatic steatosis aggravates atherosclerosis via small extracellular vesicle-mediated inhibition of cellular cholesterol efflux. J Hepatol. 2023, 79(6):1491-1501.